

**No title available.**

Patent Number: ☐ EP0698791, A4  
Publication date: 1996-02-28  
Inventor(s): KAYAHARA NORIHIKO (JP); MIYAUCHI KAZUHITO (JP); SUGIUCHI HIROYUKI (JP); OHSAWA SUSUMU (JP); SHUTOH EIKO (JP); TATANO TOSHIO (JP); UEKAMA KANETO (JP); IRIE TETSUMI (JP)  
Applicant(s): KYOWA MEDEX CO LTD (JP)  
Requested Patent: ☐ JP7301636  
Application Number: EP19950910769 19950308  
Priority Number(s): WO1995JP00379 19950308; JP19940037329 19940308; JP19940089431 19940427  
IPC Classification: G01N33/50 ; C12Q1/60 ; C12Q1/44 ; C12Q1/26 ; C12Q1/32  
EC Classification: C12Q1/60  
Equivalents: AU1862095, AU682259, CA2162286, CN1127039, JP2653755B2, KR272488, TW384311,  
☐ US5736406, ☐ WO9524647

**Abstract**

A method of determining cholesterol in a high-density lipoprotein (HDL) characterized by measuring the content of cholesterol in each of the low-density lipoprotein (LDL), very low-density lipoprotein (VLDL) and chylomicron (CM) in a specimen in the presence of a sugar compound and/or a protein-solubilizing agent and calculating the difference between the above-obtained content and the total content of cholesterol in the specimen; and a method of determining cholesterol in a HDL characterized by measuring the content of cholesterol in a HDL in a specimen in the presence of a sugar compound and/or a protein-solubilizing agent.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

**BEST AVAILABLE COPY**

<http://I2.espacenet.com/dips/abstract?CY=ep&LG=en&PN=EP0698791&PN=JP7301636&CURDRAW=0&DB=PAJ&ABSFLG=%05&>

**BEST AVAILABLE COPY**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-301636

(43) 公開日 平成7年(1995)11月14日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/92	A			
C 1 2 Q 1/26		6807-4B		
1/28		6807-4B		
1/44		6807-4B		
1/60		6807-4B		

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平6-89431	(71) 出願人	000162478 協和メデックス株式会社 東京都中央区入船二丁目1番1号
(22) 出願日	平成6年(1994)4月27日	(72) 発明者	宮内 一人 静岡県田方郡函南町仁田816-4
(31) 優先権主張番号	特願平6-37329	(72) 発明者	栢原 典彦 神奈川県川崎市麻生区東百合ヶ丘4-46-7
(32) 優先日	平6(1994)3月8日	(72) 発明者	多々納 俊雄 静岡県沼津市大岡2297-6
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	首藤 榮子 大分県大分市古国府東9組の5

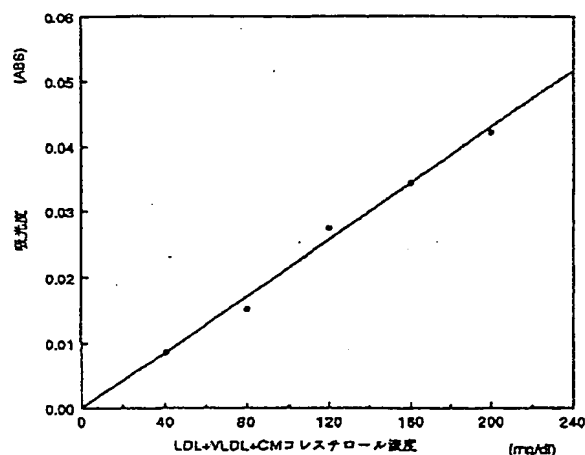
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高密度リポ蛋白中のコレステロールの定量法

(57) 【要約】

【目的】 煩雑な分画分離操作の不要な簡便な高密度リポ蛋白 (HDL) 中のコレステロールの定量法を提供する。

【構成】 糖化合物および／または蛋白可溶化剤存在下、試料中の低密度リポ蛋白 (LDL)、超低密度リポ蛋白 (VLDL) およびカイロミクロン (CM) 中のコレステロール量を測定し、試料中の総コレステロール量との差を求めることを特徴とするHDL中のコレステロールの定量法、および糖化合物および／または蛋白可溶化剤存在下、試料中のHDL中のコレステロール量を測定することを特徴とするHDL中のコレステロールの定量法。

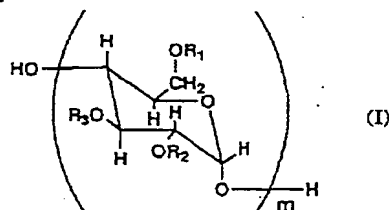


## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖化合物および／または蛋白可溶化剤存在下、試料中の低密度リポ蛋白 (LDL)、超低密度リポ蛋白 (VLDL) およびカイロミクロン (CM) 中のコレステロール量を測定し、試料中の総コレステロール量との差を求めることを特徴とする高密度リポ蛋白 (HDL) 中のコレステロールの定量法。

【請求項2】 糖化合物および／または蛋白可溶化剤存在下、試料中のHDL中のコレステロール量を測定することを特徴とするHDLコレステロールの定量法。

【請求項3】 糖化合物が一般式 (I)  
【化1】



【式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> およびR<sub>3</sub> は同一または異なって水素、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルカノイル、スルホ、- (グルコシル)<sub>p</sub>-H (式中、pは1または2を表す) または- (マルトシル)<sub>q</sub>-H (式中、qは1または2を表す) を表し、mは6~8の整数を表す] で表される化合物または一般式 (II)

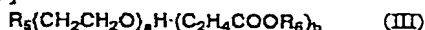
【化2】



【式中、R<sub>4</sub> は水素またはNaを表し、nは5~2000の整数を表す] で表される化合物である請求項1または請求項2記載の定量法。

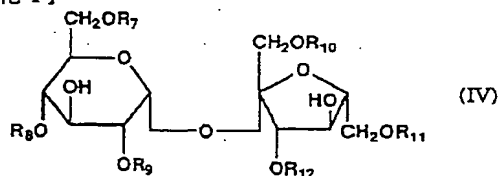
【請求項4】 蛋白可溶化剤が一般式 (III)

【化3】



【式中、aは1~2000の整数を表し、bは0または1を表し、R<sub>5</sub> はR<sub>14</sub>-X-O- (式中、R<sub>14</sub>はアルキルまたはアルケニルを表し、Xは単結合またはCOを表す) またはH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>c</sub>-N(R<sub>15</sub>)- (式中、cは1~2000の整数を表し、R<sub>15</sub>はアルキルまたはアルケニルを表す) を表し、R<sub>6</sub> はアルキルまたはアルケニルを表す] で表される化合物、一般式 (IV)

【化4】



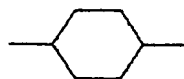
【式中、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>、R<sub>9</sub>、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub> およびR<sub>12</sub> は同一または異なってアルカノイルを表す] で表される化合物

物または一般式 (V)

【化5】



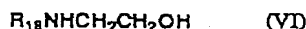
【式中、R<sub>13</sub>はアルキルまたはアルケニルを表し、Yは  
【化6】



10 -O-, -CH(R<sub>16</sub>)- (式中、R<sub>16</sub>はアルキルまたはアルケニルを表す)、-CH<sub>2</sub>CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>- (式中、dは1~22の整数を表す)、-CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>- (式中、eは1~22の整数を表す)、-OCOCH(CH<sub>2</sub>COOR<sub>17</sub>)- (式中、R<sub>17</sub>はアルキルまたはアルケニルを表す) またはこれらの混合物を表す] で表される化合物である請求項1記載の定量法。

【請求項5】 蛋白可溶化剤が一般式 (VI)

【化7】



20 【式中、R<sub>18</sub>はアルキルまたはアルケニルを表す] で表される化合物、一般式 (VII)

【化8】



【式中、R<sub>19</sub>はアルキルまたはアルケニルを表す] で表される化合物または一般式 (VIII)

【化9】



30 【式中、fは1~1000の整数を表し、R<sub>20</sub>はアルキルまたはアルケニルを表す] で表される化合物である請求項2記載の定量法。

【請求項6】 蛋白可溶化剤が胆汁酸類である請求項2記載の定量法。

【請求項7】 試料中にコレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素を作用させ生成する過酸化水素を定量することからなるコレステロール量を測定する方法において、使用するコレステロールエステル加水分解酵素またはコレステロール酸化酵素が化学修飾されたコレステロールエステラーゼまたは化学修飾されたコレステロールオキシダーゼである請求項1~請求項6記載の定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、臨床診断の分野において脂質代謝の面で重要な高密度リポ蛋白 (HDL) に含まれるコレステロール (以下、HDLコレステロールという) の定量法に関する。

【0002】

【従来の技術】 HDLは、動脈壁を含めた各組織からコレステロールを受け取るため細胞内に蓄積したコレステロールの除去作用に関係し、冠動脈硬化症をはじめとす

る各種動脈硬化症の危険予防因子であり、その血中レベルは動脈硬化性疾患の発症予知に有用な指針となることが知られている。従来のHDLコレステロールの定量法は、大きく分けて分画操作とコレステロール定量操作の2段階からなる。分画操作法には、超遠心法、免疫化学的方法、電気泳動法、沈殿法などがある。超遠心法を用いる場合には、分離用超遠心器で比重の差によってHDLを分離し、そのコレステロール量を測定する。しかしながら、定量性、簡便性、経済性などの面で欠点がある。免疫化学的方法には、免疫電気泳動法、一元免疫拡散法(SRID法)、オクタロニー法などがあるが、これらの方法を用いる場合にはアポ蛋白を認識しており、正確にはリポ蛋白を認識していないという問題がある。電気泳動法を用いる場合には、セルロースアセテート膜やアガロースゲルなどを支持体として分離し、酵素法によりコレステロールを定量する。この方法は、簡便性、経済性などの面で問題がある。沈殿法を用いる場合には、低密度リポ蛋白(LDL)、超低密度リポ蛋白(VLDL)およびカイロミクロン(CM)の表面に存在するアポ蛋白Bにポリエチレングリコール、ヘパリン、リンタンゲステン酸、デキストラン硫酸などのポリアニオンと2価の陽イオンを結合させ、不溶性沈殿物を形成させ、これを遠心分離操作によって除去し、上清中のHDLコレステロールを定量する(臨床検査法提要、第29版、金井泉著、金原出版、471頁、1983年)。この方法は最も簡便であるが、遠心分離器による遠心分離操作を行うため、多数検体処理、迅速測定および臨床検査の分野で多く使用されている自動分析装置には不向きである。さらに、従来の分画法では、分離したHDL画分を定量ピペットではかり取る場合などに人的誤差も生じ易い。以上のように、HDLコレステロール測定の煩雑さは、その分画操作にある。しかしながら、単純にHDLを分画せずに血清検体を直接コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼが含有された試薬に添加しても、総コレステロールを定量する系と変わりがなく、HDLコレステロールを特異的に定量できない。特開昭63-126498には、コール酸類を添加してその特異性を高めることが記載されているが、この方法では、HDLのみならずLDL、VLDLなども徐々に反応し完全な反応終点が得られにくいことにより、特異性が必ずしも充分でない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、煩雑な分画分離操作の不要な簡便なHDLコレステロールの定量法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、糖化合物および/または蛋白可溶化剤を存在させたコレステロール測定試薬の系により超遠心で分画されたHDL、LDL、VLDLおよびCMの各リポ蛋白を用いて測定した

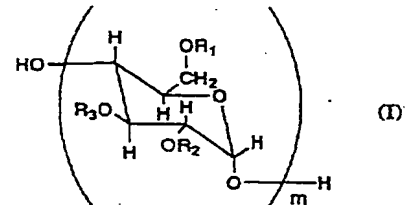
ところ、糖化合物および/または蛋白可溶化剤の組み合わせにより各リポ蛋白との反応性が異なり、その結果HDLコレステロール、LDLコレステロール、VLDLコレステロール、CMコレステロールの反応性が異なることを見出し、本発明に至った。

【0005】本発明は、糖化合物および/または蛋白可溶化剤存在下、試料中のLDL、VLDLおよびCM中のコレステロール量を測定し、試料中の総コレステロール量との差を求めることを特徴とするHDLコレステロールの定量法に関する。また、本発明により、糖化合物および/または蛋白可溶化剤存在下、試料中のHDL中のコレステロール量を測定することを特徴とするHDLコレステロールの定量法を提供することができる。

【0006】糖化合物としては、一般式(I)

【0007】

【化10】



【0008】【式中、 $R_1$ 、 $R_2$  および  $R_3$  は同一または異なって水素、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルカノイル、スルホ、-(グルコシル) $_p$ -H (式中、 $p$  は1または2を表す) または-(マルトシル) $_q$ -H (式中、 $q$  は1または2を表す) を表し、 $m$  は6~8の整数を表す] で表される化合物または一般式(II)

【0009】

【化11】



【0010】【式中、 $R_4$  は水素またはNaを表し、 $n$  は5~2000の整数を表す] で表される化合物が好ましく用いられる。また、試料中のLDL、VLDLおよびCM中のコレステロール量を測定する際の蛋白可溶化剤としては、一般式(III)

【0011】

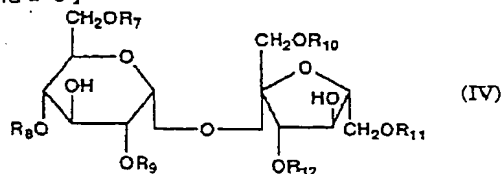
【化12】



【0012】【式中、 $a$  は1~200の整数を表し、 $b$  は0または1を表し、 $R_5$  は $R_{14}-X-O-$  (式中、 $R_{14}$  はアルキルまたはアルケニルを表し、 $X$  は単結合またはCOを表す) または $H-(CH_2CH_2O)_c-N(R_{15})-$  (式中、 $c$  は1~200の整数を表し、 $R_{15}$  はアルキルまたはアルケニルを表す) を表し、 $R_6$  はアルキルまたはアルケニルを表す] で表される化合物、一般式(IV)

【0013】

【化13】



【0014】(式中、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ および $R_{12}$ は同一または異なってアルカノイルを表す)で表される化合物または一般式(V)

【0015】

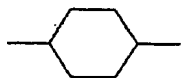
【化14】



【0016】(式中、 $R_{13}$ はアルキルまたはアルケニルを表し、Yは

【0017】

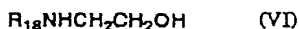
【化15】



【0018】 $-O-$ 、 $-CH(R_{16})-$ (式中、 $R_{16}$ はアルキルまたはアルケニルを表す)、 $-CH_2CH(OH)(CH_2)_d-$ (式中、 $d$ は1~22の整数を表す)、 $-CH=CH(CH_2)_e-$ (式中、 $e$ は1~22の整数を表す)、 $-OCOCH(CH_2COOR_{17})-$ (式中、 $R_{17}$ はアルキルまたはアルケニルを表す)またはこれらの混合物を表す)で表される化合物が、試料中のHDL中のコレステロール量を測定する際の蛋白可溶化剤としては、一般式(VI)

【0019】

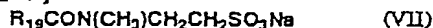
【化16】



【0020】(式中、 $R_{18}$ はアルキルまたはアルケニルを表す)で表される化合物、一般式(VII)

【0021】

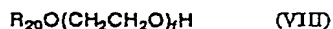
【化17】



【0022】(式中、 $R_{19}$ はアルキルまたはアルケニルを表す)で表される化合物、一般式(VIII)

【0023】

【化18】



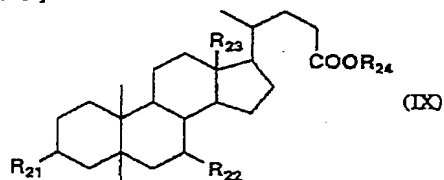
【0024】(式中、 $f$ は1~100の整数を表し、 $R_{20}$ はアルキルを表す)で表される化合物または胆汁酸類が好ましく用いられる。以下、一般式(I)~一般式(VIII)で表される化合物をそれぞれ化合物(I)~化合物(VIII)という。一般式(I)~一般式(VIII)の各基の定義において、アルキルおよびアルカノイルのアルキル部分としては、直鎖または分枝状の炭素数1~22の、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピ

ル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、デシル、ペンタデシル、イコサニル、ドコサニルなどがあげられ、アルケニルとしては、炭素数2~22の、例えば、ビニル、プロベニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプテニル、デセニル、ペンタデセニル、イコセニル、ドコセニルなどがあげられる。

【0025】置換アルキルおよび置換アルカノイルの置換基としては、例えば、ヒドロキシ、カルボキシ、スルホなどがあげられる。胆汁酸類としては、例えば一般式(IX)

【0026】

【化19】



【0027】(式中、 $R_{21}$ および $R_{22}$ は同一または異なって水素、 $-OR_{25}$ (式中、 $R_{25}$ は水素、スルホまたは $SO_3Na$ を表す)またはオキソを表し、 $R_{23}$ は水素または $-OR_{25}$ (式中、 $R_{25}$ は前記と同義である)を表し、 $R_{24}$ は水素、アルキル、アルケニルまたは金属を表す)で表される化合物があげられる。金属としては、ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ土類金属などがあげられ、アルキルおよびアルケニルは前記と同義である。

【0028】糖化合物としては、化合物(I)または化合物(II)の中でもシクロデキストリン誘導体が、特にメチル化シクロデキストリンなどが好ましく用いられる。例えば、 $\alpha$ -シクロデキストリン、 $\gamma$ -シクロデキストリン、ジメチル $\beta$ -シクロデキストリン、トリメチル $\beta$ -シクロデキストリン、ヒドロキシエチル $\beta$ -シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピル $\alpha$ -シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピル $\beta$ -シクロデキストリン、カルボキシメチル $\beta$ -シクロデキストリン、グリコシル $\beta$ -シクロデキストリン、マルトシル $\alpha$ -シクロデキストリン、マルトシル $\beta$ -シクロデキストリン、パーシャリーメチル $\beta$ -シクロデキストリン、 $\alpha$ -シクロデキストリンスルフェート、 $\beta$ -シクロデキストリンスルフェートなどがあげられる。

【0029】試料中のLDL、VLDLおよびCM中のコレステロール量を測定する際の蛋白可溶化剤としては、化合物(III)、化合物(IV)または化合物(V)などの界面活性剤の中でも、特にノニオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤などが好ましく用いられる。ノニオン系界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエ

ーテル、ポリオキシエチレンステアリルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレンベヘニルエーテル、ポリオキシエチレンモノラウレート、ポリオキシエチレンモノステアレート、ポリオキシエチレンモノオレレート、ポリオキシエチレンラウリルアミン、ポリオキシエチレンステアリルアミン、しよ糖脂肪酸エステルなどがあげられ、アニオン系界面活性剤としては、例えば、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ノルマルドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、高級アルコール硫酸エステルソーダなどがあげられる。

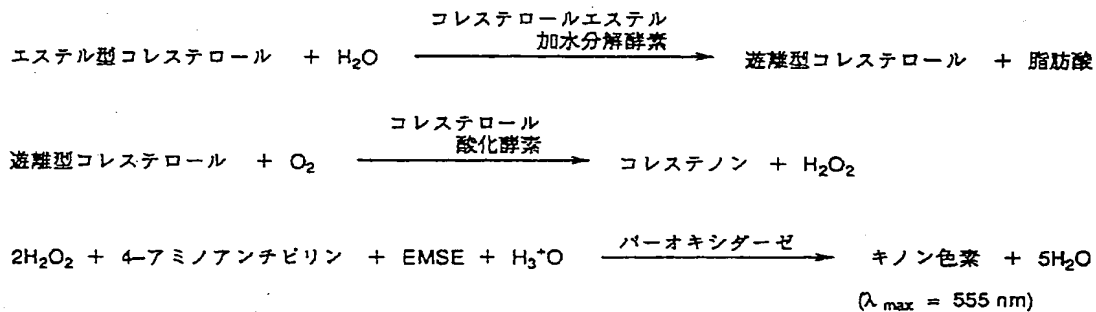
【0030】試料中のHDL中のコレステロール量を測定する際の蛋白可溶化剤としては、化合物(VI)、化合物(VII)、化合物(VIII)または胆汁酸類などの界面活性剤の中でも、特にカチオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤、ノニオン系界面活性剤、胆汁酸塩などが好ましく用いられる。カチオン系界面活性剤としては、例えば、オキシエチレンドデシルアミン、ポリオキシエチレンドデシルアミン、ポリオキシエチレンオクタデシルアミンなどがあげられ、アニオン系界面活性剤としては、例えば、ココイルメチルタウリン酸ナトリウム、ラウロイルメチルタウリン酸ナトリウム、ミリストイルメチルタウリン酸ナトリウム、バルミトイルメチルタウリ\*

\*ン酸ナトリウム、ステアロイルメチルタウリン酸ナトリウムなどがあげられ、ノニオン系界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンステアリルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレンベヘニルエーテルなどがあげられ、胆汁酸塩としては、例えば、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸ナトリウム、ウルソデオキシコール酸ナトリウム、リトコール酸ナトリウム、イソケノデオキシコール酸ナトリウム、7-オキシリトコール酸ナトリウム、12-オキシリトコール酸ナトリウム、12-オキシケノデオキシコール酸ナトリウム、7-オキシデオキシコール酸ナトリウムなどがあげられる。

【0031】本発明は、糖化合物および/または蛋白可溶化剤をコレステロール測定試薬系と共存させる点に特徴を有するものであり、コレステロール測定系自体は下記の反応原理に基づく一般法に従うものである。ただし、色原体および測定波長はこれに限定されるものではない。

【0032】

【数1】



EMSE: N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン

【0033】コレステロールエステル加水分解酵素あるいはコレステロール酸化酵素としては、通常市販されている、コレステロールエステルを加水分解する能力を有する微生物または動物由来のコレステロールエステラーゼやリポプロテインリパーゼ、コレステロールを酸化して過酸化水素を生成する微生物由来のコレステロールオキシダーゼなどがあげられるが、これら酵素の特異性、安定性をさらにあげるためにポリエチレングリコールを主成分とする基、水溶性のオリゴ糖残基、スルホプロピル基などで上記の酵素を化学的に修飾したものも用いられる。また、遺伝子操作により得られる酵素も用いられる。

【0034】本発明方法は、血液、尿などのHDLを含

有する体液に適用できる。次に、本発明の定量法について説明する。本発明を実施するに際しては、まず、糖化合物溶液および/または蛋白可溶化剤溶液を調製する。糖化合物溶液は、糖化合物を適当な緩衝液、例えば50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)に溶解し、反応時に例えば100 mM以下、好ましくは3~80 mMの濃度になるように調製する。なお、糖化合物はあらかじめコレステロール測定試薬中に共存させておいてもよい。蛋白可溶化剤溶液は、コレステロール測定試薬と共存させ、反応時に例えば50 g/l以下、好ましくは0.1~20 g/lの濃度になるように調製する。試薬は、糖化合物溶液および/またはコレステロール測定試薬が共存した蛋白可溶化剤溶液から調製し、20~50

℃、好ましくは30～40℃で約5分保温する。次いで、上記試薬に試料そのものもしくは必要に応じて水あるいは生理食塩水で希釈した試料を加え、5～30分間反応させる。反応終了後、反応液の吸光度を500～600nm、例えば555nmで測定し、コレステロール量を算出する。試料中のLDL、VLDLおよびCM中のコレステロール量を測定した場合には、別に総コレステロール量を求め、これらの差を求めることによりHDLコレステロールが定量できる。

【0035】血清から超遠心により分画されたHDL、LDL、VLDLおよびCMの各フラクションを使用し、上記試薬によりコレステロール量を測定した。その結\*

第1表

糖化合物	HDL	LDL	VLDL	CM
α-シクロデキストリン	+	++	++	++
β-シクロデキストリン	+	++	++	++
γ-シクロデキストリン	+	++	++	++
ジメチル-β-シクロデキストリン	-	+++	+++	+++
トリメチル-β-シクロデキストリン	-	+++	+++	+++
ヒドロキシエチル-β-シクロデキストリン	-	++	++	++
2-ヒドロキシプロピル-α-シクロデキストリン	+	++	++	++
2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン	-	++	++	++
カルボキシメチル-β-シクロデキストリン	+	++	++	++
グルコシル-β-シクロデキストリン	+	++	++	++
マルトシル-α-シクロデキストリン	+	++	++	++
マルトシル-β-シクロデキストリン	+	++	++	++
パーシャリーメチル-β-シクロデキストリン	+	++	++	++
α-シクロデキストリンスルフェート	+	++	++	++
β-シクロデキストリンスルフェート	+	++	++	++

-, +, ++, +++はそれぞれ反応の強さを示し、-<+<++<+++である

【0038】コレステロール測定試薬に糖化合物ジメチル-β-シクロデキストリン5mMおよび蛋白可溶化剤5g/lを組み合わせて共存させたときの各リポ蛋白の※

第2表

蛋白可溶化剤	HDL	LDL	VLDL	CM
ポリオキシエチレンラウリルエーテル	-	+++	+++	+++
ポリオキシエチレンセチルエーテル	+	+++	+++	+++
ポリオキシエチレンステアリルエーテル	-	+++	+++	+++
ポリオキシエチレンオレイルエーテル	+	+++	+++	+++
ポリオキシエチレンベヘニルエーテル	+	+++	+++	+++
ポリオキシエチレンモノラウレート	-	+++	+++	+++
ポリオキシエチレンモノステアレート	-	+++	+++	+++
ポリオキシエチレンモノオレエート	-	+++	+++	+++
ポリオキシエチレンラウリルアミン	-	+++	+++	+++
ポリオキシエチレンステアリルアミン	-	+++	+++	+++
シヤ糖脂肪酸エステル	+	++	++	++
ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム	+	++	++	++
ノルマルドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム	+	++	++	++
ラウリル硫酸ナトリウム	+	++	++	++
高級アルコール硫酸エステルソーダ	-	+++	+++	+++

-, +, ++, +++はそれぞれ反応の強さを示し、-<+<++<+++である

\*果、糖化合物および蛋白可溶化剤の組み合わせによりHDLコレステロール、LDLコレステロール、VLDLコレステロール、CMコレステロールの反応性が異なり、糖化合物および蛋白可溶化剤の組み合わせにより各リポ蛋白との反応性が異なることが確認された。

【0036】コレステロール測定試薬に糖化合物5mMおよび蛋白可溶化剤ポリオキシエチレンラウリルエーテル5g/lを組み合わせて共存させたときの各リポ蛋白の反応性の差を第1表に示す。

【0037】

【表1】

【0040】コレステロール測定試薬に糖化合物5mM 50 および蛋白可溶化剤オキシエチレンジデシルアミン5g

／1を組み合わせて共存させたときの各リポ蛋白の反応性 \* 【0041】  
性の差を第3表に示す。 \* 【表3】

第3表

糖化合物	HDL	LDL	VLDL	CM
α-シクロデキストリン	++	+	+	+
β-シクロデキストリン	++	+	+	+
γ-シクロデキストリン	++	+	+	+
ジメチル-β-シクロデキストリン	+++	+	+	+
トリメチル-β-シクロデキストリン	+++	+	+	+
ヒドロキシエチル-β-シクロデキストリン	++	+	+	+
2-ヒドロキシプロピル-α-シクロデキストリン	++	+	+	+
2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン	++	+	+	+
カルボキシメチル-β-シクロデキストリン	++	+	+	+
グルコシル-β-シクロデキストリン	++	+	+	+
マルトシル-α-シクロデキストリン	++	+	+	+
マルトシル-β-シクロデキストリン	++	+	+	+
パーシャリーメチル-β-シクロデキストリン	++	+	+	+
α-シクロデキストリンスルフェート	++	+	+	+
β-シクロデキストリンスルフェート	++	+	+	+

+, ++, +++はそれぞれ反応の強さを示し, + < ++ < +++である

【0042】 コレステロール測定試薬に糖化合物ジメチル 20※反応性の差を第4表に示す。  
ル-β-シクロデキストリン 5 mMおよび蛋白可溶化剤 【0043】  
5 g／1を組み合わせて共存させたときの各リポ蛋白の※ 【表4】

第4表

蛋白可溶化剤	HDL	LDL	VLDL	CM
オキシエチレンデシルアミン	+++	+-	+-	+-
ポリオキシエチレンデシルアミン	++	+	+	+
ポリオキシエチレンオクタデシルアミン	++	+	+	+
ココイルメチルタウリン酸ナトリウム	++	+	+	+
ラウロイルメチルタウリン酸ナトリウム	++	+	+	+
ミリスチルメチルタウリン酸ナトリウム	++	+	+	+
パルミトイルメチルタウリン酸ナトリウム	++	+	+	+
ステアロイルメチルタウリン酸ナトリウム	++	+	+	+
ポリオキシエチレンラウリルエーテル	++	+	+	+
ポリオキシエチレンセチルエーテル	++	+	+	+
ポリオキシエチレンステアリルエーテル	++	+	+	+
ポリオキシエチレンオレイルエーテル	++	+	+	+
ポリオキシエチレンベヘニルエーテル	++	+	+	+
コール酸ナトリウム	+++	+	+	+
デオキシコール酸ナトリウム	+++	+	+	+

+, ++, +++はそれぞれ反応の強さを示し, +- < + < ++ < +++である

【0044】 第1表～第4表に示されるように、第1表  
または第2表の組み合わせの場合はLDL、VLDLお  
よびCM中のコレステロール量から間接的にHDL中の  
コレステロール量を測定することができ、第3表または  
第4表の組み合わせの場合は直接的にHDL中のコレ  
ステロール量を測定することができる。次に、実施例によ  
って本発明の態様を説明する。

【0045】

【実施例】

実施例1

ジメチル-β-シクロデキストリン (5 mM)、ポリオ

キシエチレンラウリルアミン (5 g／1)、コレステロ  
ールエステラーゼ (1.0 U／ml)、コレステロール  
オキシダーゼ (5.0 U／ml)、4-アミノアンチピ  
リン (2.2 mM)、EMSE (1.1 mM) および3  
0 mMグッド緩衝液 (pH 6.75) からなる試薬を調  
製した。試料としては、血清から超遠心で分画されたL  
DL、VLDL、CMの混合サンプルを用いた。あらか  
じめ37℃で加温した上記試薬3 mlにサンプル50 μ  
lを混和し、37℃で15分間反応させ、得られた溶液  
の555 nmにおける吸光度を測定した。

【0046】 その結果を第1図に示す。第1図は、LD



L+VLDL+CMコレステロール濃度と吸光度との相関関係を示すもので、LDL+VLDL+CMコレステロール濃度は吸光度とよい相関を示した。

#### 【0047】実施例2

血清から超遠心で分画されたLDL、VLDL、CMの混合サンプルの代わりに血清サンプルを用いる以外は実施例1と同様の操作を行って吸光度を測定し、第1図を基準に血清サンプル中のLDL+VLDL+CMコレステロール濃度(A)を求めた。別に、血清サンプル中の総コレステロール濃度(B)を、酵素法のコレステロール測定試薬で測定し、求めた。HDLコレステロール濃度は、 $[(B)-(A)]$ とした。対照法として、デキストラン硫酸-リンタングステン酸-Mg沈殿法〔デタミナーHDL(協和メデックス社製)で沈殿〕(臨床化学、初版、荻三男著、医典社、110頁、1987年)を用いて、血清サンプル中のHDLコレステロール濃度を求めた。

【0048】その結果、本発明の方法による結果は沈殿法による結果と良好な相関を示した〔相関係数 $r=0.8320$ ( $n=20$ )〕。

#### 【0049】実施例3

ジメチル- $\beta$ -シクロデキストリン(5mM)、ポリオキシエチレンラウリルアミン(5g/l)、コレステロールエステルゼ(1.0U/ml)、コレステロールオキシダーゼ(5.0U/ml)、4-アミノアンチピリン(2.2mM)、EMSE(1.1mM)および30mMグッド緩衝液(pH6.75)からなる試薬の代わりにヒドロキシエチル- $\beta$ -シクロデキストリン(10mM)、ポリオキシエチレンモノラウレート(0.5g/l)、コレステロールエステルゼ(1.0U/ml)、コレステロールオキシダーゼ(5.0U/ml)、4-アミノアンチピリン(2.2mM)、EMSE(1.1mM)、30mMグッド緩衝液(pH6.75)からなる試薬を用いる以外は実施例2と同様の操作を行い、沈殿法による結果と比較した。

【0050】その結果を第5表に示す。

【0051】

【表5】

第 5 表

サンプル	HDLコレステロール濃度 (mg/dl)	
	本発明の方法	沈殿法
1	49	42
2	75	68
3	83	75
4	53	58
5	94	96

【0052】第5表に示すように、本発明の方法による結果は沈殿法による結果と良好な相関を示した。

#### 【0053】実施例4

ジメチル- $\beta$ -シクロデキストリン(5mM)、ポリオ

キシエチレンラウリルアミン(5g/l)、コレステロールエステルゼ(1.0U/ml)、コレステロールオキシダーゼ(5.0U/ml)、4-アミノアンチピリン(2.2mM)、EMSE(1.1mM)および30mMグッド緩衝液(pH6.75)からなる試薬の代わりにジメチル- $\beta$ -シクロデキストリン(5mM)、コレステロールエステルゼ(1.0U/ml)、コレステロールオキシダーゼ(5.0U/ml)、4-アミノアンチピリン(2.2mM)、EMSE(1.1mM)および30mMグッド緩衝液(pH6.75)からなる試薬を用いる以外は実施例2と同様の操作を行い、沈殿法による結果と比較した。

【0054】その結果、本発明の方法による結果は沈殿法による結果と良好な相関を示した〔相関係数 $r=0.969$ ( $n=20$ )〕。

#### 【0055】実施例5

ジメチル- $\beta$ -シクロデキストリン(5mM)、オキシエチレンジシルアミン(0.25g/l)、コレステロールエステルゼ(1.0U/ml)、コレステロールオキシダーゼ(5.0U/ml)、4-アミノアンチピリン(2.2mM)、EMSE(1.1mM)、30mMグッド緩衝液(pH6.75)からなる試薬を調製した。試料としては、血清から超遠心で分画されたHDLのサンプルを用いた。あらかじめ37℃で加温した上記試薬3mlにサンプル50 $\mu$ lを混和し、37℃で15分間反応させ、得られた溶液の555nmにおける吸光度を測定した。

【0056】その結果を第2図に示す。第2図は、HDLコレステロール濃度と吸光度との相関関係を示すもので、HDLコレステロール濃度は吸光度とよい相関を示した。

#### 【0057】実施例6

血清から超遠心で分画されたHDLのサンプルの代わりに血清サンプルを用いる以外は実施例5と同様の操作を行って吸光度を測定し、第2図を基準に血清サンプル中のHDLコレステロール濃度を求めた。対照法として、デキストラン硫酸-リンタングステン酸-Mg沈殿法〔デタミナーHDL(協和メデックス社製)で沈殿〕(臨床化学、初版、荻三男著、医典社、110頁、1987年)を用いて、血清サンプル中のHDLコレステロール濃度を求めた。

【0058】その結果、本発明の方法による結果は沈殿法による結果と良好な相関を示した〔相関係数 $r=0.889$ ( $n=20$ )〕。

#### 【0059】実施例7

ジメチル- $\beta$ -シクロデキストリン(5mM)、オキシエチレンジシルアミン(0.25g/l)、コレステロールエステルゼ(1.0U/ml)、コレステロールオキシダーゼ(5.0U/ml)、4-アミノアンチピリン(2.2mM)、EMSE(1.1mM)、30

mMグッド緩衝液 (pH 6.75) からなる試薬の代わりに、コール酸ナトリウム (5 mg/ml)、ポリエチレングリコールで修飾したコレステロールエステラーゼ (1.0 U/ml)、ポリエチレングリコールで修飾したコレステロールオキシダーゼ (5.0 U/ml)、4-アミノアンチピリン (2.2 mM)、EMSE (1.1 mM)、30 mMグッド緩衝液 (pH 6.75) からなる試薬を用いる以外は実施例 6 と同様の操作を行い、沈殿法による結果と比較した。

【0060】その結果、本発明の方法による結果は沈殿法による結果と良好な相関を示した〔相関係数  $r = 0.980$  (n=40)〕。

980 (n=40)〕。

【0061】

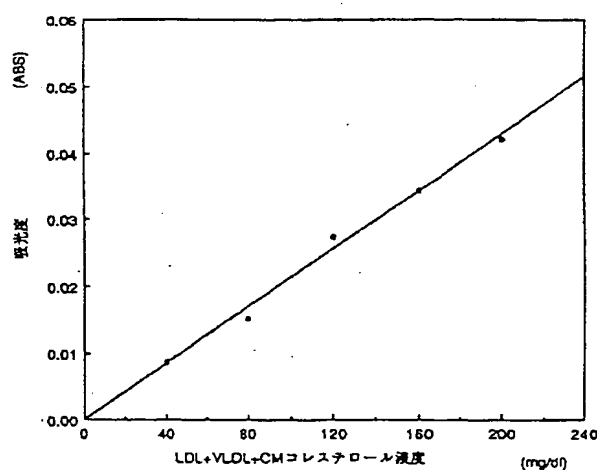
【発明の効果】本発明により、煩雑な分画分離操作の不要な簡便なHDLコレステロールの定量法が提供される。

【図面の簡単な説明】

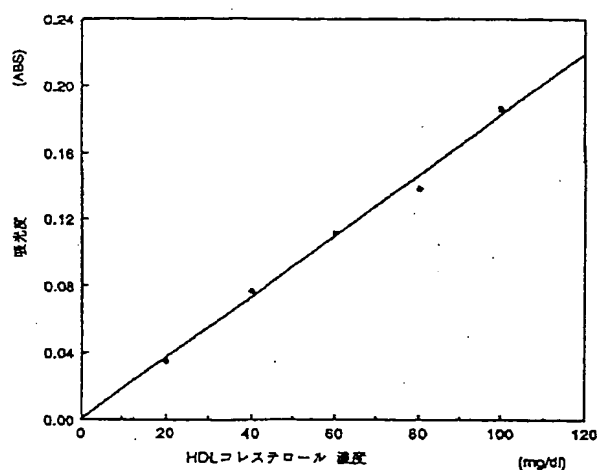
【図1】LDL+VLDL+CMコレステロール濃度と本発明の方法により測定された吸光度との相関関係を示すものである。

【図2】HDLコレステロール濃度と本発明の方法により測定された吸光度との相関関係を示すものである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

G01N 21/31  
21/77

識別記号

庁内整理番号

Z  
B

F I

技術表示箇所

(72)発明者 杉内 博幸  
熊本県熊本市長嶺町1675-31  
(72)発明者 入江 徹美  
熊本県熊本市健軍町2484-17

(72)発明者 上釜 兼人  
熊本県熊本市長嶺町1716-80  
(72)発明者 大澤 進  
千葉県四街道市みそら4-17-9

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**